

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA DL50 DE VENENOS BOTRÓPICOS. IV POSSIBILIDADE DE DETERMINAÇÃO DA DL50 DO VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS*

RAYMUNDO ROLIM ROSA*, SIRDÉIA MAURA PERRONE FURLANETTO**, MEDARDO SILES VILLARROEL*** E WALTER BANCHER****

RESUMO: O emprego de camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758 — possibilita a determinação da DL50 do veneno de *Bothrops alternatus* Dumeril, Bibron et Dumeril, 1854, através de inoculação por via intravenosa, constituindo, pois, uma exceção dentre os venenos botrópicos já estudados^{1, 2, 3}. A inoculação de doses infra-letais duas horas antes, ao invés de dessensibilizar os animais, conforme ocorre com outros venenos botrópicos, provoca efeito oposto. A aplicação de um veneno altamente coagulante (*B. moojeni* Hoge, 1965) em dose que produz incoagulabilidade sanguínea (2 µg), induz uma sensibilidade maior a doses posteriores do veneno de *B. alternatus*.

UNITERMOS: Veneno botrópico; determinação da DL50 de veneno de *Bothrops alternatus*.

INTRODUÇÃO

Quando vários grupos de camundongos são inoculados pela via venosa com doses crescentes de venenos de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948), *Bothrops insularis* (Amaral, 1921), *Bothrops neuwiedi* Wagler in Spix, 1824, *Bothrops fonsecai* Hoge et Belluomini, 1959 ou de *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1884, as mortes consequentes não guardam proporcionalidade com a progressão das doses e algumas dessas mortes tendem a ocorrer dentro dos primeiros dez minutos após a inoculação¹.

Todavia, quando camundongos são tratados previamente com doses preparatórias (D.P.) do próprio veneno, suportam, duas horas após, elevadas quantidades do mesmo veneno, sem que ocorram mortes dentro dos primeiros dez minutos². Somente quando as doses inoculadas forem muito acima dos valores da

* Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan, Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

*** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

**** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Endereço para correspondência: CEP 05504 - Caixa Postal, 65 - São Paulo - Brasil.

DL50 é possível, nos animais tratados com D.P., repetir-se o fenômeno das mortes imediatas, porém, neste caso, parecem ocorrer por um mecanismo de ação diferente, provavelmente por "choque proteotóxico" ou "anafilactoide" e não por coagulação intravascular, uma vez que a D.P. provoca incoagulabilidade sanguínea a qual atinge o seu máximo efeito duas horas após sua aplicação². Por outro lado, os animais tratados com D.P. e que sobrevivem aos primeiros dez minutos após a aplicação de doses elevadas, poderão apresentar intoxicação fatal tardia (24 a 48 horas), ocasionada por um terceiro mecanismo de ação do veneno botrópico.

Furlanetto et al.³ (1973c) demonstraram, ainda, haver efeito cruzado entre D.P. e doses devidamente escalonadas e suficientes para a determinação da DL50 dos venenos de *B. moojeni*, *B. jararaca* e *neuwiedi*.

Assim, propusemo-nos a estudar a determinação da DL50 do veneno de *B. alternatus*, espécie responsável por grande número de acidentes e cuja distribuição geográfica se estende pelos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Rio de Janeiro, no Brasil, e norte da Argentina, Uruguai e Paraguai⁴.

Além disso, decidimos analisar, também, o efeito da D.P. do veneno de *B. moojeni* e do veneno de *B. alternatus*, sobre o valor da DL50 deste último.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos utilizados: trabalhamos com os venenos de *Bothrops alternatus* e de *Bothrops moojeni*. Os métodos de conservação e utilização dos mesmos, foram os descritos por Furlanetto et al¹. (1973 a).

As tabelas apresentadas expressam resultados através de uma relação numérica onde sempre o numerador representa o número de animais mortos e o denominador o total de animais inoculados em cada dose.

Todos os ensaios apresentam DL50 que foram calculadas com os resultados verificados após 24 e 48 horas das inoculações, pelo método de Reed & Müenich (1938).

Animais: foram utilizados camundongos de 18 a 22 g, sem distinção de sexo, provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan; as inoculações eram feitas pela via venosa.

Furlanetto et al.¹ (1973 a) demonstraram ser impossível a determinação da DL50, em camundongos inoculados pela via venosa, dos venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. pradoi*, *B. insularis*, *B. neuwiedi*, *B. fonsecai* e *B. jararacussu*, sem antes injetar uma pequena quantidade do veneno em estudo, ou de outro proveniente de uma das espécies citadas. Estabeleceram como "dose preparatória" ou D.P., aquela correspondente a dois microgramas de veneno de *B. moojeni*, com dose mínima coagulante igual a 0,4 micrograma, inoculada pela via venosa, duas horas antes das doses devidamente escalonadas do veneno em estudo.

O veneno de *B. alternatus* não foi minuciosamente estudado por Furlanetto et al. ^{1, 2, 3} (1973a, 1973b e 1973c) na mesma época, porquanto o mesmo parecia diferir dos demais venenos botrópicos analisados.

Realmente, a tabela 1 apresenta um ensaio, igual a muitos outros que realizamos e que julgamos desnecessárias suas reproduções, que mostra ser perfei-

tamente possível a determinação da DL50 do veneno em causa, diretamente, prescindindo, pois, do emprego de D.P. Tal resultado pode estar correlacionado com o índice coagulante do veneno de *B. alternatus* determinado por Rosenfeld et al.⁹ (1959) pelo método, ligeiramente modificado, de Laki⁵ (1951), os quais, atribuindo o índice 1,0 ao veneno de *B. jararaca* tomado como padrão, encontraram, para o veneno de *B. alternatus* o valor 0,51.

Uma vez verificada a desnecessidade da inoculação de D.P. para a avaliação da DL50 do veneno de *B. alternatus*, conforme o demonstrado pela tabela 1, ocorreu-nos estudar o efeito que a dose preparatória poderia ocasionar. Confrontando-se os resultados das tabelas 1 e 2, verifica-se que não houve a dessensibilização intensa assinalada com outros venenos botrópicos, provocando, até pelo contrário, uma sensibilização dos animais a doses posteriores do veneno em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1

ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA DL50 DO VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS*. CADA DOSE ERA INOCULADA PELA VIA VENOSA EM CAMUNDONGOS DE 18 A 22 g

Tempo de Observação	Doses em microgramas							DL50
	10,0	12,6	15,9	20,0	25,2	31,7	40,0	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	
24 horas	0/10	0/10	0/10	3/10	5/10	8/10	6/10	26,9 µg
48 horas	0/10	0/10	0/10	3/10	5/10	9/10	9/10	24,7 µg

TABELA 2

ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA DL50 DO VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS* EM CAMUNDONGOS DE 18 A 22 G, TRATADOS 2 HORAS ANTES COM 2 MICROGRAMAS DO VENENO DE *BOTHROPS MOOJENI* (D.P.)

Tempo de Observação	Doses em microgramas							DL50
	10,0	12,6	15,9	20,0	25,2	31,7	40,0	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
24 horas	0/10	0/10	3/10	3/10	8/10	9/10	10/10	21,4 µg
48 horas	0/10	1/10	3/10	4/10	8/10	9/10	—	20,4 µg

TABELA 3

ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA DL50 DO VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS* EM CAMUNDONGOS DE 18 A 22 G, TRATADOS 2 HORAS ANTES COM 2 MICROGRAMAS DO PRÓPRIO VENENO (D.P.)

Tempo de Observação	Doses em microgramas							DL50
	10,0	12,6	15,9	20,0	25,2	31,7	40,0	
10 minutos	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
60 minutos	0/10	0/10	0/10	1/10	4/10	3/10	4/10	
24 horas	1/10	4/10	5/10	9/10	10/10	10/10	10/10	14,6 µg
48 horas	1/10	4/10	5/10	9/10	—	—	—	14,6 µg

O efeito verificado com a D.P. preparada com o veneno de *B. moojeni*, apresentado pela tabela 2, é mais evidente quando se empregam como D.P., 2 microgramas do próprio veneno, o que se pode constatar cotejando os resultados das tabelas 1 e 3. Parece-nos que se poderia pensar num efeito maior que a simples somatória das doses "preparatória" e finais. Há, pois, neste caso particular, um fenômeno inverso daquele descrito por Furlanetto et al.^{2, 3} (1973b e 1973c) e que constitue, certamente, uma exceção só encontrada, até agora, com o veneno de *B. alternatus*. Tal resultado também não se coaduna com os dados de dessensibilização cruzada, encontrada em órgãos de outras espécies animais, apresentados por Rocha e Silva⁷ (1951). Por outro lado, os presentes resultados se assemelham àqueles encontrados quando se trabalha com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768)⁸.

CONCLUSÕES

1. Contrariamente ao que acontece com o veneno de outras serpentes do gênero *Bothrops*, a DL50 do veneno de *Bothrops alternatus* pode ser determinada através de inoculações de doses escalonadas pela via intravenosa, em camundongos, de modo direto.

2. A aplicação de 2 microgramas como D.P. do veneno de *Bothrops moojeni* na determinação da DL50 do veneno de *B. alternatus*, parece induzir u'a maior sensibilidade nos camundongos.

3. A inoculação de 2 microgramas de veneno de *B. alternatus* como D.P., em camundongos, induz a uma baixa significativa do valor da DL50 do mesmo.

ABSTRACT: The use of mice *Mus musculus* permits the calculation of the LD50 of *Bothrops alternatus* venom by intravenous inoculation which is an exception to the *Bothrops* venoms already studies by the authors. Inoculation of sub lethal doses two hours before does not desensitize the animals as occurs with other *Bothrops* venoms but provokes the opposite effect.

The application of a highly coagulant venom (*B. moojeni*) in doses which prevents coagulation of the blood (2 µg) appears to induce an increased sensitivity to subsequent doses of *B. alternatus* venom.

UNITERMS: *Bothrops* venoms; LD50 determination of *Bothrops alternatus* venom.

BIBLIOGRAFIA

1. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y.Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I. Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50. *Mem. Inst. Butantan*, 37:99-107, 1973a...
2. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. II. Possibilidade de determinação da DL 50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan*, 37:109-122, 1973b.
3. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. III. Possibilidade da determinação da DL50 através da proteção cruzada conferida por doses infra-letais de outros venenos de serpentes do mesmo gênero. *Mem. Inst. Butantan*, 37:113-129, 1973c.
4. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. — Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, 36:109-208, 1972.
5. LAKI, K. — The polymeration of protein the action of thrombin on fibrinogen. *Arch. Biochem.* New York, 32:317-324, 1951.
6. REED, L.J. & MÜENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27(3):493-497, 1938.
7. ROCHA E SILVA, M. — *Bradicinina, preparação, ensaio biológico, identificação*. Rio de Janeiro, 1951, p. 3 e 10./Tese/. Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil.
8. ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, S.M.P.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Mem. Inst. Butantan*, 37:131-137, 1973.
9. ROSENFIELD, G.; HAMPE, O.G. & KELEN, E.M.A. — Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29:143-163, 1959.

